甜菜夜蛾拓扑异构酶 I 氨基酸突变对其 DNA 解旋活性的影响

张 佩，张 兰，张燕宁，贾 伟，蒋红云*

（中国农业科学院植物保护研究所，农业部作物有害生物综合治理综合性重点实验室，北京 100193）

摘要：【目的】为了探究甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 拓扑异构酶 I(topoisomerase I, Top I)氨基酸突变对其 DNA 解旋活性的影响。【方法】通过克隆甜菜夜蛾 *Top I* 基因,构建原核表达载体,采用完全重叠 PCR 定点突变技术,向甜菜夜蛾 Top I 的 V420, L530, A653 和 S729(根据人 Top I 氨基酸序列编号)4 个位点引入突变,将改造成功的重组 *Top I* 基因转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)中,诱导重组蛋白表达、纯化,测定 Top I 突变对其解旋活性的影响。【结果】完全重叠 PCR 能实现甜菜夜蛾 *Top I* 定点突变。重组蛋白在体外得到稳定的表达,表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析在 96.0 kDa 处出现特异性条带。通过对重组蛋白分离纯化并测定对质粒 pBR322 解旋酶活性,发现引入 V420I, L530P 和 A653T 突变后 Top I 的比活力显著降低,而引入 S729T 突变后比活力与野生型蛋白无显著差异。【结论】本研究证明在甜菜夜蛾 Top I 中引入 V420I, L530P 和 A653T 突变后,其对底物 pBR322 的解旋活性显著降低,为后期探索甜菜夜蛾 Top I 的定点突变与其对喜树碱及其衍生物敏感性的关系奠定了基础。

关键词：甜菜夜蛾；拓扑异构酶 I；突变；氨基酸替换；DNA 解旋活性；pBR322

中图分类号：Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2015)09-0933-08

Effects of amino acid substitutions of topoisomerase I on its DNA relaxation activity in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHANG Pei, ZHANG Lan, ZHANG Yan-Ning, JIA Wei, JIANG Hong-Yun* (State Key Laboratory for Biology of plant disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to investigate the effects of amino acid substitutions of topoisomerase I (Top I) on its DNA relaxation activity in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). 【Methods】The NH_2-terminally truncated *Top I* (*Top*70) from *S. exigua* was amplified and cloned into the *Bam*H I-*Sal* I sites of the pGEX-4T-1. Mutant constructs substituted with V420I, L530P, A653T and S729T (numbered according to human Top I) were obtained by PCR-based site-directed mutagenesis using the wild construct pGEX-4T-1-*Top*70 as the template separately. The wild and mutated constructs were expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). The GST fusion protein was purified using GSTrap 4B, and the DNA relaxation activity of the purified protein was detected with pBR322 as substrate. 【Results】The wild and mutated pGEX-4T-1-*Top*70 expression vector was successfully constructed, and the cell line stably expressing Top70 was established. A 96.0 kDa specific protein band appeared when the expressed protein was analyzed with SDS-PAGE. Compared to the wild Top I, the mutated Top I with amino acid substitutions at positions V420I, L530P and A653T had significantly decreased DNA relaxation toward pBR322. However, the S729T amino acid substitution showed no significant impact on the catalytic efficiency of Top I. 【Conclusion】These results suggest that V420T, L530P and A653T amino acid mutations in *S. exigua* remarkably decline the affinity of Top I to pBR322, providing important basic information for further investigating the sensitivity of Top I to the camptothecin and its analogous.

Key words: *Spodoptera exigua*; topoisomerase I; mutagenesis; amino acid substitution; DNA relaxation activity; pBR322

基金项目：国家自然科学基金项目(31371967, 31272079)

作者简介：张佩，女，1989 年 6 月生，湖南长沙人，硕士研究生，主要从事农药毒理及天然产物化学研究，E-mail：zhangpei198906@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：PTNPC@vip.163.com；hyjiang@ippcaas.cn

收稿日期 Received：2015-04-23；接受日期 Accepted：2015-06-23

拓扑异构酶 I(topoisomerase I, Top I)广泛存在于生物体内,主要参与调控 DNA 拓扑结构的变化。通过磷酸酪氨酸键与 DNA 连接,形成 DNA-Top I 二元复合物,使 DNA 双链发生暂时或者局部解旋作用,解开 DNA 超螺旋结构,释放 DNA 内由解旋所产生的扭转张力,促进 DNA 高效运转(Wang, 2002)。在 DNA 复制、转录和重组过程中发挥重要作用(Chillemi *et al*., 2004; Losasso *et al*., 2007)。作为喜树碱(camptothecin, CPT)等抗癌类药物的作用靶标,DNA-Top I 二元复合物能与 CPT 发生可逆性结合,导致 DNA 解旋反应终止,Top I-DNA-CPT 三元复合物积累,阻止 Top I 对断裂 DNA 的再连接作用,影响 DNA 切口修复,使 DNA 处于断裂状态,最终引发细胞死亡(Liu *et al*., 2000; Lorence *et al*., 2004)。

生物在进化过程中,功能性蛋白部分位点会发生改变,影响其生物活性,表现出物种差异性。基于内生性有毒代谢物自我防御机制,喜树碱类植物体内产生了具有 CPT-抗性的 Top I。Sirikantaramas 等(2008)通过比较喜树碱类植物和非喜树碱类植物后,发现前者体内 Top I 在 N421, L530 和 N722 位点存在多型性。通过向日本蛇根草 *Ophiorrhiza japonica Top I* 中引入这些突变,发现除第 420 位点外,其他位点都产生 CPT 抗性,当同时替换 I530L 和 S722N 后,Top I 对 CPT 敏感性增强(Sirikantaramas *et al*., 2015)。因此,可以推测喜树植物体内的 CPT 抗性与其体内 Top I 靶位点突变有关。

临床上通过对癌细胞内的 Top I 进行分析后,发现 CPT-抗性细胞系内 Top I 部分位点已发生氨基酸替换(Moisan *et al*., 2006)。通过将癌细胞长期暴露在含有 CPT 的环境下筛选出来的具有 CPT 抗性细胞系中,也发生了特定位点的突变(Urasaki *et al*., 2001a, 2001b; Arakawa *et al*., 2013; Amit *et al*., 2014)。通过对人类 Top I 特定位点进行氨基酸替换后,可以体外获取具有 CPT 及其类似物抗性的 Top I (Chillemi *et al*., 2004; Benkert *et al*., 2011; Tesauro *et al*., 2013; Amit *et al*., 2014)。说明 *Top I* 突变对 CPT 的敏感性产生了影响。

本课题组对已知的昆虫 Top I 氨基酸序列进行同源性分析,发现在与 CPT 直接或间接相关的氨基酸位点 V420, L530, A653 和 S729 存在多型性(Zhang *et al*., 2013)。对于这些位点的多型性对昆虫 Top I 结构和功能的影响尚不清楚。因此,本文通过 PCR 法向甜菜夜蛾 Top I 中分别引入上述突变,并进行原核表达与纯化,比较其纯化蛋白对底物解旋活性的差异,探索甜菜夜蛾 Top I 多型性对其功能的影响,为进一步揭示其对 CPT 敏感性的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

DNA 聚合酶(LA Taq®), DL2000 Marker, DL10000 Marker, pBR322, *Bam*H I, *Sal* I 限制性内切酶和蛋白质分子量标准(低)购自宝生物工程(大连)有限公司产品。定点突变试剂盒(Easy Mutagenesis System)和质粒纯化试剂盒(EasyPure Plasmid MiniPrep Kit)购自北京全式金生物技术有限公司。DH5α 克隆菌株和 BL21 (DE3)表达菌株购自天根生化科技(北京)有限公司。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-Gal), pGEM-T easy, 以及 T4 DNA 连接酶为 Promega 产品。GSTrap 4B 纯化柱和 pGEX-4T-1 均为 GE Healthcare 产品。本实验室已获得含甜菜夜蛾 *Top* I 基因全长(GenBank 登录号: JN258956)的质粒 pGEX-4T-1-*Top I*(Zhang *et al*., 2013)。

1.2 *Top I* 原核表达载体的构建

用含有甜菜夜蛾 *Top* I 全长的克隆质粒 pGEX-4T-1-*Top* I 为模板,设计含有 *Bam*H I 和 *Sal* I 限制性酶切位点的引物,扩增去除 N 端 335 个氨基酸,保留剩余的 ORF 序列(*Top*70 序列),得到的 PCR 产物纯化、连接载体 pGEM-T easy 测序准确无误后,纯化产物 *Top*70 序列和表达载体 pGEX-4T-1 进行双酶切,在 T4 DNA 连接酶的作用下,4℃连接过夜,构建表达质粒 pGEX-4T-1-*Top*70。采用热击法将 pGEX-4T-1-*Top*70 转化至感受态大肠杆菌细胞 DH5α 中,筛选阳性克隆测序。

引物序列如下:

TOP70S: 5′-GCTCGGATCCAAACCAGTGAAAGTCAAACAAACTCAAGT-3′(下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点);

TOP70X: 5′-CATGTCGACGAAGATATATTCCGGCCCCGCCA-3′(下划线部分为 *Sal* I 酶切位点)。

1.3 定点突变

按照试剂盒 Easy Mutagenesis System 说明书进行。设计 4 对完全重叠引物(表 1),以测序正确无误的重组质粒 pGEX-4T-1-*Top*70 为模板,采用 KOD plus 酶进行 PCR 扩增,分别引入定点突变。用 *Dpn* I 酶 37℃对 PCR 产物酶切 1 h,去除产物中的非突变

表 1　定点突变引物

Table 1　Primers for site-directed mutagenesis

突变位点 Mutation site	引物序列(5′–3′) Primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature
V420I	F：GCTTCATGGACAGAAAAT***A***TACAAGGACAAGC R：GCTTGTCCTTGTA***T***ATTTTCTGTCCATGAAGC	61.5
L530P	F：GTTGTGTTCGATTTTCC***C***TGGTAAAGATTC R：GAATCTTTACCAG***G***GAAAATCGAACACAAC	66.2
A653T	F：GCTTTGAAAGAGAAAATACAA***A***CTAAACGTGATCAAGTGGATG R：CATCCACTTGATCACGTTTAG***T***TTGTATTTTCTCTTTCAAAGC	66.2
S729T	F：CTCGATCCACGTATAA***A***CAGTAGCTTGGTGC R：GCACCAAGCTACTG***T***TATACGTGGATCGAG	66.6

下划线示突变氨基酸密码子；斜体加粗为突变碱基 。Mutated amino acid codon is underlined, and mutated base pair is indicated in italic and bold.

型质粒模板，将 PCR 产物转化进 DMT 感受态细胞中，并均匀的涂布于含 Amp(100 μmol/L)的 LB 平板上，37℃倒置培养 16 h 后，挑取白色菌落摇菌过夜，提取重组质粒测序鉴定。

1.4　重组蛋白表达

将突变成功的重组质粒转化至表达菌株 BL21(DE3)中，并均匀地涂布于含 Amp(100 μmol/L)的 LB 平板上，37℃倒置培养 16 h 后，挑取阳性表达菌落，摇菌过夜，将菌液用含 75 μg/mL Amp 的液体 LB 培养基，以 1∶100 比例(v/v)进行稀释，37℃ 200 r/min 振荡培养 3 h，至对数生长期(OD_{600} = 0.4 ~ 0.6)时，用不同浓度的 IPTG(终浓度分别为 0.1，0.2，0.4，0.6，0.8 和 1.0 mmol/L)诱导重组蛋白表达，SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。

1.5　重组蛋白纯化

收集菌悬液，加入 40 mL 含 250 μg/mL 溶菌酶的 PBS(pH 7.4，140 mmol/L NaCl，2.7 mmol/L KCl，10 mmol/L Na_2HPO_4，1.8 mmol/L KH_2PO_4)，冰浴超声 5 s，间歇 15 s，Amp 60%，重复上述循环 3 min。将裂解液于 4℃ 5 000 r/min 离心 30 min，去除细胞碎片。4℃条件下，通过 GSTrap 4B 纯化柱对裂解液上清进行分离纯化，收集蛋白洗脱液，SDS-PAGE 分析蛋白纯化情况。通过考马斯亮蓝法对纯化蛋白进行定量，纯化产物 –80℃留存用以活性测定。

1.6　解旋活性测定

取 36 ng 纯化蛋白，采用二倍酶液稀释法(Zhang *et al.*，2013)，将裂解液上清按等比例稀释，27℃反应 30 min。反应体系总体积为 20 μL，包括酶液稀释液，1 × Top I 反应缓冲液，0.5 μg pBR322 DNA 和 ddH_2O。加入 1 μL 250 μg /mL 蛋白酶 K 和 2 μL 5% SDS 终止反应 30 min。将反应液 5 000 g 离心 1 min 后，取 10 μL 上清液与 2 μL 6 × Loading buffer 混匀后，凝胶电泳，在 25 μmol/L 溴化乙锭溶液中染色 10 min，使用凝胶成像仪对电泳结果进行凝胶成像。凝胶电泳图中质粒 DNA 可以分为超螺旋型 Sc，松弛型 R 和缺口型 N 3 种类型。

1.7　数据分析

在 27℃ 30 min 内能将 0.5 μg 超螺旋 DNA 转换成 100% 松弛型 pBR322 DNA 的酶的活性为 1 U。采用二倍稀释法测定酶活性，体系内的酶活力单位按指数变化，根据酶液稀释倍数换算酶活。其中每毫克蛋白质所具有的酶活性单位数定义为 Top I 比活力，以 U/mg 表示。

2　结果

2.1　原核表达载体的构建

由于 Top I 在大肠杆菌表达时，蛋白质 N-端易发生水解，影响蛋白质的稳定性。大量研究发现去除 N-端后，Top I 能保持酶的全部活性(Redinbo *et al.*，1998)。因此，本实验仅扩增了去除 N-端 335 个氨基酸后的 ORF 的 *Top*70 序列，其大小为 1 780 bp(图 1：A)。PCR 产物经回收、链接、转化和测序准确无误后，与表达载体 pGEX-4T-1 分别进行双酶切，并连接形成重组质粒 pGEX-4T-1-*Top*70，转化至感受态大肠杆菌细胞 DH5α，筛选阳性克隆，提取质粒进行酶切验证，得到大小分别约 2 000 和 5 000 bp 的条带(图 1：B)，并送质粒测序，证明重组质粒 pGEX-4T-1-*Top*70 正确构建完成。

2.2　甜菜夜蛾 Top I 的定点突变

为了明确甜菜夜蛾 Top I 氨基酸突变对其解旋活性的影响，以 pGEX-4T-1-*Top*70 为模板，通过完全重叠 PCR 法向甜菜夜蛾 *Top I* 中引入 V420I，L530P，A653T 和 S729T 突变，扩增产物为线性 DNA，对扩增产物进行电泳。重组质粒由 4 978 bp 的 pGEX-4T-1 和 1 782 bp 的目标序列片段组成。

结果显示，在 6 700 bp 处均可见清晰的特异性条带（图 2），与预期值一致。蓝白斑筛选阳性克隆，提取质粒并测序。验证结果表明，在预期位点实现了定点突变，并且未引入其他突变。

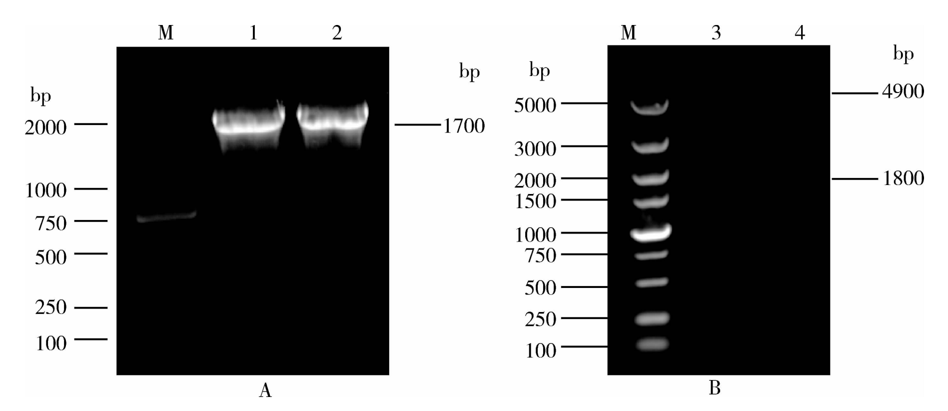


图 1 甜菜夜蛾 *Top*70 原核表达载体的构建及酶切鉴定

Fig. 1 Construction and restriction digestion of prokaryotic expression vector of *Top*70 of *Spodoptera exigua*

A：*Top*70 克隆 Cloning of *Top*70；B：重组表达载体 pGEX-4T-1-*Top*70 的酶切验证 Enzymatic digestion verification of recombination plasmid pGEX-4T-1-*Top*70；M：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker；1，2：*Top*70 PCR 产物 PCR product of *Top*70；3，4：酶切产物 Product of restriction digestion.

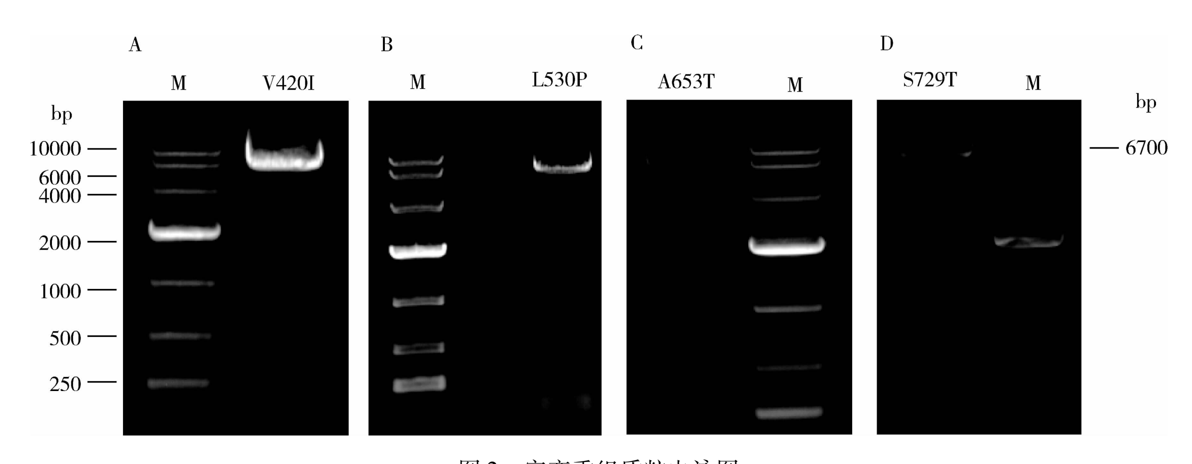


图 2 突变重组质粒电泳图

Fig. 2 Mutated recombination plasmid pGEX-4T-1-*Top*70

M：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker.

2.3 重组蛋白的诱导表达

将测序验证无误的质粒转化至表达菌株中，挑取单菌落扩大培养，至细胞对数生长期，加入不同浓度的 IPTG 诱导目的蛋白表达，通过 SDS-PAGE 检测目的蛋白表达。作为原核表达载体，pGEX-4T-1 序列中含有 Tac 强启动子和谷胱苷肽-S-转移酶序列（GST 标签），在诱导表达时，大小约为 26.0 kDa。由 *Top*70 产生的蛋白质分子量理论值为 70.0 kDa 左右，因此，重组蛋白大小应为 96.0 kDa。SDS-PAGE 结果显示（图 3），空载体在 26.0 kDa 处有一深色条带，经 IPTG 诱导后，重组蛋白出现在 96.0 kDa 处，与推测的理论值一致。且不同浓度 IPTG 均能诱导重组载体上 Tac 启动子表达目的蛋白，但表达量存在微小差异，其中 IPTG 最佳诱导浓度为 1.0 mmol/L。与野生型蛋白相比，在相同浓度的 IPTG 诱导下，突变蛋白表达量下降。

2.4 重组蛋白的分离纯化

由于融合蛋白中含有 GST 标签，通过与纯化柱上的谷胱甘肽基团连接，防止被 PBS 洗脱，而裂解液中的非特异性杂蛋白则主要通过 PBS 除去。洗脱液中的还原型谷胱甘肽，可竞争性置换出结合的重组蛋白，将目的蛋白逐级洗脱下来，实现重组蛋白的分离纯化。

收集诱导后的细胞，对细胞进行超声波处理，释放细胞内容物。离心去除细胞碎片，取上清液进行分离纯化，并对洗脱液进行 SDS-PAGE 鉴定（图 4），发现在 96.0 kDa 附近存在单一条带，即为目的蛋白，但电泳结果显示，纯化初始，洗脱液中仍有部分

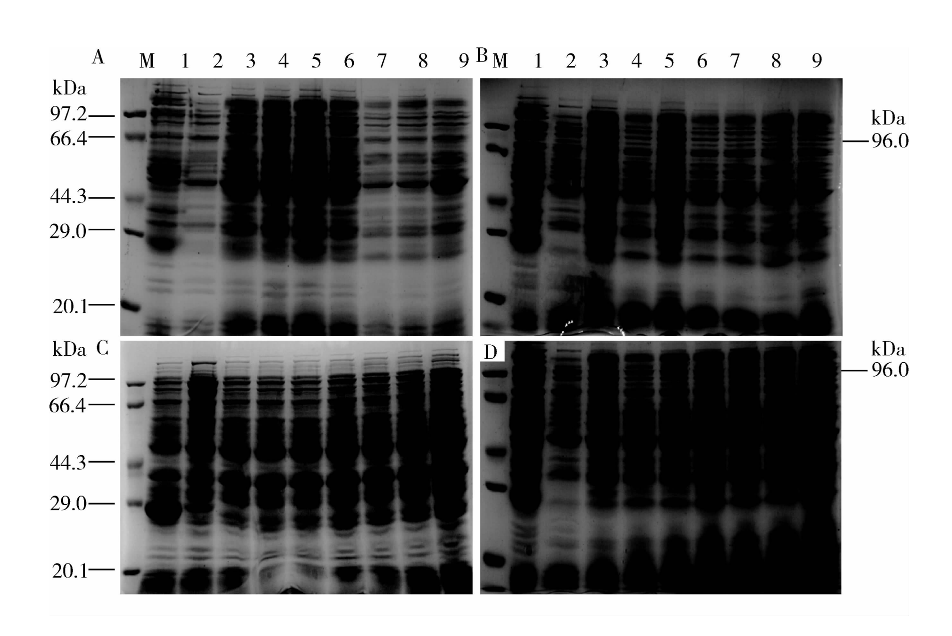


图 3　SDS-PAGE 分析 *Top*70 突变基因的原核表达

Fig. 3　Prokaryotic expression of mutated *Top*70 analyzed by SDS-PAGE

A：V420I；B：L530P；C：A653T；D：S729T. M：蛋白分子量标准物 Protein molecular weight marker；1：空载体 pGEX-4T-1；2：1.0 mmol/L IPTG 诱导的未突变 Top70 Wild type protein Top70 induced with 1 mmol/L IPTG；3 -9：0，0.1，0.2，0.4，0.6，0.8 和 1.0 mmol/L IPTG 诱导的突变蛋白 Mutant protein induced with 0，0.1，0.2，0.4，0.6，0.8 and 1.0 mmol/L IPTG.

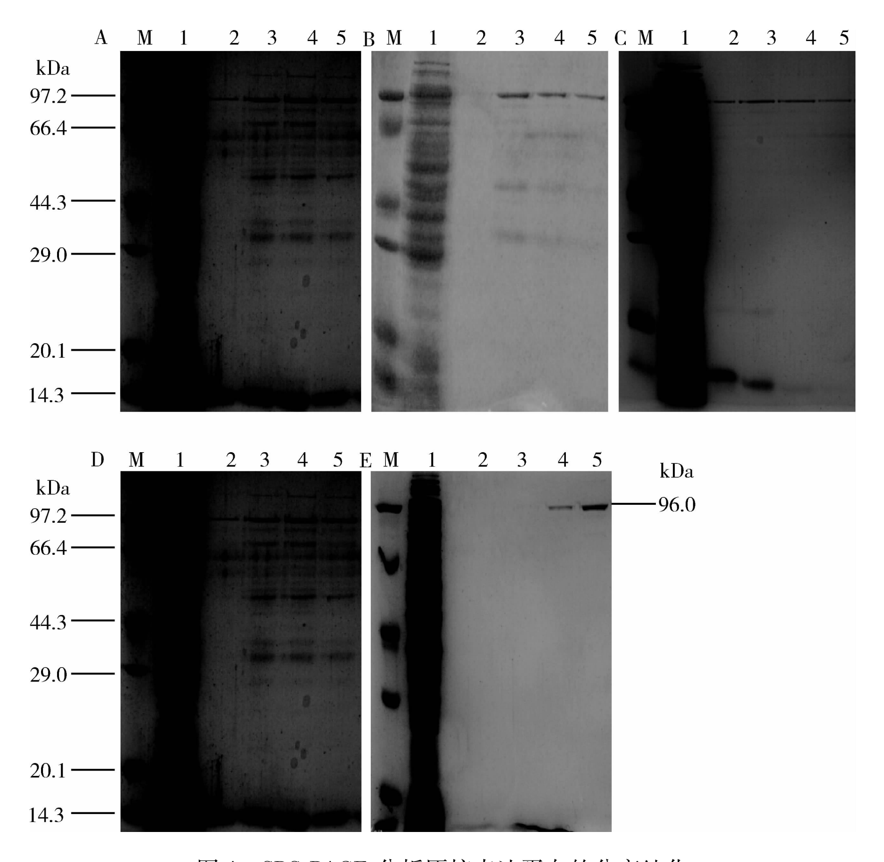


图 4　SDS-PAGE 分析原核表达蛋白的分离纯化

Fig. 4　Purification of the recombinant proteins analyzed by SDS-PAGE

A：未突变的 Top70 Wild protein Top70；B：V420I；C：L530P；D：A653T；E：S729T. M：标准分子质量蛋白 Protein molecular weight marker；1：细菌裂解液上清 Supernatant of cell lysates；2 -5：不同时间收集的纯化蛋白 Serial collections of eluted fusion protein.

杂带存在,随着洗脱时间的延长,杂质蛋白消失,此时收集到的重组蛋白纯度较高,可用于后续活性的研究。

2.5 突变蛋白的解旋活性

从图 5 可以看出,将酶液按等比例稀释后,酶的解螺旋活性会随着酶液稀释倍数的增加而降低,超螺旋状的 pBR322 含量增加,而松弛状和缺口状 DNA 含量减少。

对于突变蛋白而言,可通过比较纯化蛋白的比活力,判断突变对 TopI 解旋酶活性的影响。突变前和突变后各位点蛋白酶活性结果如表 2 所示。各突变蛋白的酶比活力较突变前均被抑制。A653T 突变后蛋白的解旋活性下降最明显,野生型蛋白的酶比活力是该突变蛋白的 70 倍;V420I 或 L530P 位点突变后的酶比活力与未突变的 Top70 比活力差异性均小于 10 倍。而 S729T 位点突变后的酶比活力与未突变的 Top 70 无显著差异(图 5)。

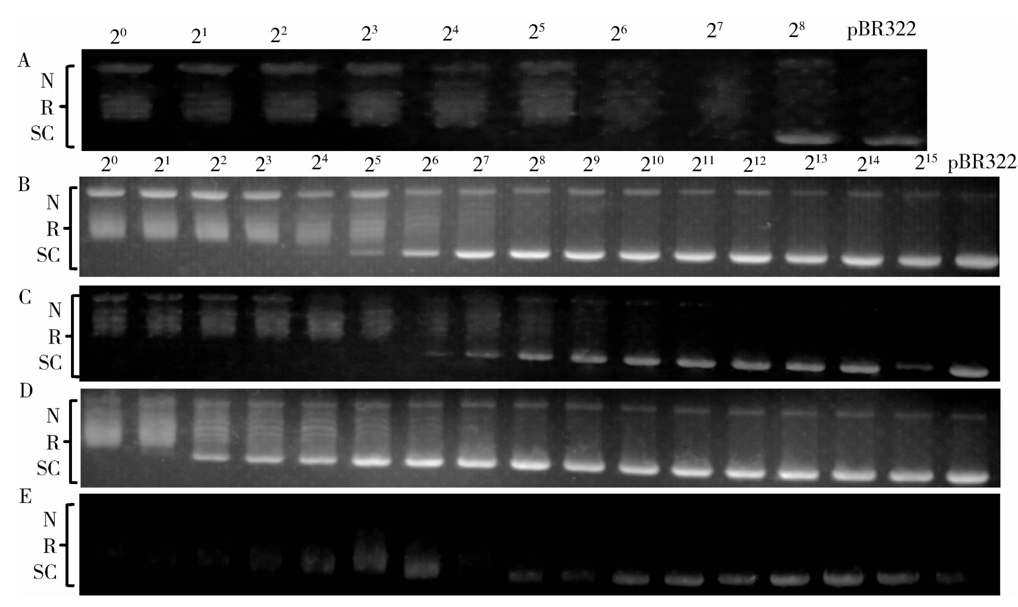


图 5 突变的 Top70 纯化酶液比活力

Fig. 5 Specific activity of purified enzyme of Top70 after site-directed mutation

A: 未突变的 Top70 Wild type protein Top70; B: V420I; C: L530P; D: A653T; E: S729T. Sc: 超螺旋 DNA Supercoiled DNA; R: 解旋 DNA Relaxed DNA; N: 带切口 DNA Nicked DNA; 2^0, 2^1, …, 2^{15}: 酶液 2 倍稀释 Serial two-fold dilutions.

表 2 突变的 Top70 纯化酶液酶活力单位和比活力

Table 2 The enzyme unit and specific activity of purified enzyme of Top70 after site-directed mutation

突变位点 Mutation site	蛋白质量(ng) Protein quantity	酶活力单位(U) Enzyme unit	比活力(U/mg pro) Specific activity
未突变 Top70 Wild protein Top70	36	2.56×10^5	7.11×10^9
V420I	36	3.20×10^4	$8.89\times10^{8*}$
L530P	36	1.28×10^5	$3.56\times10^{8*}$
A653T	36	4.00×10^3	$1.11\times10^{8*}$
S729T	36	2.56×10^5	7.11×10^9

星号表示比活力较野生型显著下降。The asterisk indicates that the specific activity is remarkably reduced.

3 讨论

本研究通过完全重叠 PCR 向甜菜夜蛾 *Top I* 引入突变,并通过原核表达及纯化得到突变蛋白,测定野生型蛋白和突变蛋白比活力。在自然条件下,生物体内相邻的多个碱基同时发生突变的概率较低,因此,本研究根据氨基酸密码子的简并性,仅替换特定氨基酸密码子的一个碱基,实现目标氨基酸突变,并保证其他序列不变。但生物体内存在密码子偏好性,不同密码子在基因中出现的频率存在较大差异。编码同一氨基酸,不同生物,所对应的密码子及使用频率不同。甚至同种生物不同蛋白序列,对氨基酸的选择也不一样。此现象会影响外源基因在宿主细胞中的表达量。当 *Top*70 碱基序列未发生突变时,突变靶标氨基酸的密码子偏好性与宿主菌株一致,

重组蛋白表达量较大。而替换成不同碱基后，被替换的氨基酸密码子与宿主细胞偏好性存在差异，导致其表达速率下降，蛋白表达量减少，但均无包涵体形成。

结果显示，引入突变后甜菜夜蛾 Top I 对底物 pBR322 的解旋活性发生了不同改变。其中引入 V420I，L530P 和 A653T 突变后，甜菜夜蛾 Top I 对 pBR322 的解旋比活力显著降低，而引入 S729T 突变后，酶比活力与野生型无显著差异。突变能改变原有残基对蛋白质的影响，使蛋白质的性质发生改变，引起原始结构的波动。真核生物 Top I 由 NH_2-端（第 1－214 位），核心区（第 215－635 位），链接区（第 636－712 位）以及 COOH-端（第 713－765 位）4 个结构域组成（Fiorani *et al.*, 2005），其中核心区和 C-端对维持 Top I 解旋酶活性必不可少，且真核生物的 5 个保守的氨基酸残基均存在于这 2 个区域内（Redinbo *et al.*, 2000）。本研究中，V420 和 L530 2 个位点均位于核心区，分别位于 I 和 Ⅲ 2 个亚区结构域内，根据酶-DNA 晶体结构可知，这 2 个区域为 DNA 夹的主要组成部分（Redinbo *et al.*, 1998）。亚区结构域 I 的保守性高，该区域在底物识别方面发挥重要作用（Fiorani *et al.*, 2003）。因此，本实验中当甜菜夜蛾 Top I 发生 V420I 突变后，可能导致 Top I 对 DNA 的识别速率下降，影响 DNA 结合速率，使酶解旋活性受到抑制。Ⅲ亚区结构域内含有除 T723 外的所有保守型催化残基（Yang *et al.*, 2009），该区稳定性对酶催化活性的维持至关重要。而 L530 则可能通过影响Ⅲ亚区与 DNA 的结合能力，影响酶解旋作用。由 L530P 比活力可知，突变后，酶的解旋活性下降，说明 L530P 突变改变酶对 DNA 的结合能力，降低酶解旋速率。

S729 位点位于 C-端，该位点的氨基酸主要参与维持酶疏水口袋结构的稳定性。通过向人类 Top I 的第 729 位引入不同氨基酸后，酶与 DNA 的结合能力存在较大差异（Chillemi *et al.*, 2008；Losasso *et al.*, 2008）。比较突变前后蛋白解旋酶活性，发现甜菜夜蛾 Top I 的解旋酶活性不受 Thr 突变的影响，酶对 DNA 的亲和性不变，由此可知 Thr 和 Ser 在维持酶结构稳定性方面发挥同等的作用，突变后，酶的疏水口袋结构未发生改变。

链接区在控制 DNA 旋转/再连接方面发挥重要作用，链接区主要参与酶的再连接反应，对于调节酶动力学具有重要意义。该区的灵活性能影响酶与 DNA 的结合能力。当人类 Top I 第 653 位 Ala 突变为 Pro 时，酶结合口袋的空间构象变大，使酶对 DNA 的亲和性增加，DNA 的结合增强，酶的再连接活性增强，促进了 DNA 解螺旋作用（Fiorani *et al.*, 2003）。当将甜菜夜蛾 Top I 的 A653 替换成 Thr 后，酶的催化活性被严重抑制，由此推论，突变后，酶的空间构象减小，酶的灵活性明显减小，对 DNA 亲和力降低，解旋活性受到抑制。

突变后，甜菜夜蛾 Top I 的解旋酶活性发生了一定的变化，但是酶对抑制剂的敏感性还有待进一步分析。可以通过已构建的甜菜夜蛾 Top I 体外反应系统，研究突变后蛋白对 CPT 及其衍生物的敏感性差异，确定该类药物的害虫防治谱，并开展以昆虫 Top I 酶为靶标的药物高通量筛选，促进以 Top I 为靶标的新农药的创制。

参考文献（References）

Amit R, Tesauro C, Frohlich R, Hede MS, Nielsen MJ, Kjeldsen E, Bonven B, Stougaard M, Gromova I, Knudsen BR, 2014. Decreased camptothecin sensitivity of the stem-cell-like fraction of Caco2 cells correlates with an altered phosphorylation pattern of topoisomerase I. *PLoS ONE*, 9(6): e99628.

Arakawa Y, Ozaki K, Okawa Y, Yamada H, 2013. Three missense mutations of DNA topoisomerase I in highly camptothecin-resistant colon cancer cell sublines. *Oncol. Rep.*, 30(3): 1053－1058.

Benkert P, Biasini M, Schwede T, 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3): 343－350.

Chillemi G, D'Annessa I, Fiorani P, Losasso C, Benedetti P, Desideri A, 2008. Thr729 in human topoisomerase I modulates anti-cancer drug resistance by altering protein domain communications as suggested by molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res.*, 36(17): 5645－5651.

Chillemi G, Redinbo M, Bruselles A, Desideri A, 2004. Role of the linker domain and the 203－214 N-terminal residues in the human topoisomerase I DNA complex dynamics. *Biophys. J.*, 87(6): 4087－4097.

Fiorani P, Bruselles A, Falconi M, Chillemi G, Desideri A, Benedetti P, 2003. Single mutations in the linker domain confers protein flexibility and camptothecin resistance to human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 278(44): 43268－43275.

Fiorani P, Chillemi G, Losasso C, Castelli S, Desideri A, 2005. The different cleavage DNA sequence specificity explains the camptothecin resistance of the human topoisomerase I Glu418Lys mutant. *Nucleic Acids Res.*, 34(18): 5093－5100.

Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP, 2000. Mechanism of action of camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 922(1): 1－10.

Lorence A, Medina-Bolivar F, Nessler CL, 2004. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. *Plant Cell Rep.*, 22(6): 437－441.

Losasso C, Cretaio E, Fiorani P, D'Annessa I, Chillemi G, Benedetti P, 2008. A single mutation in the 729 residue modulates human DNA topoisomerase IB DNA binding and drug resistance. *Nucleic Acids Res.*, 36(17): 5635-5644.

Losasso C, Cretaio E, Palle K, Pattarello L, Bjornsti MA, Benedetti P, 2007. Alterations in linker flexibility suppress DNA topoisomerase I mutant-induced cell lethality. *J. Biol. Chem.*, 282(13): 9855-9864.

Moisan F, Longy M, Robert J, Morvan VL, 2006. Identification of gene polymorphisms of human DNA topoisomerase I in the National Cancer Institute panel of human tumour cell lines. *Br. J. Cancer*, 95(7): 906-913.

Redinbo MR, Champoux JJ, Hol WGJ, 2000. Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA. *Biochemistry*, 39(23): 6832-6840.

Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WGJ, 1998. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*, 279(5356): 1504-1513.

Sirikantaramas S, Meeprasert A, Rungrotmongkol T, Fuji H, Hoshino T, Sudo H, Yamazaki M, Saito K, 2015. Structural insight of DNA topoisomerase I from camptothecin-producing plants revealed by molecular dynamics simulations. *Phytochemistry*, 113: 50-56.

Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K, 2008. Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(18): 6782-6786.

Tesauro C, Rocca BMD, Ottaviani A, Coletta A, Zuccaro L, Arno B, D'Annessa I, Fiorani P, Desideri A, 2013. Molecular mechanism of the camptothecin resistance of Glu710Gly topoisomerase IB mutant analyzed *in vitro* and *in silico*. *Mol. Cancer*, 12(100): 1-13.

Urasaki Y, Laco G, Takebayashi Y, Bailly C, Kohlhagen G, Pommier Y, 2001a. Use of camptothecin-resistant mammalian cell lines to evaluate the role of topoisomerase I in the antiproliferative activity of the indolocarbazole. *Cancer Res.*, 61(2): 504-508.

Urasaki Y, Laco GS, Pourquier P, Takebayashi Y, Kohlhagen G, Gioffre C, Zhang HL, Chatterjee D, Pantazis P, Pommier Y, 2001b. Characterization of a novel topoisomerase I mutation from a camptothecin-resistant human prostate cancer cell line. *Mol. Cancer*, 12(1): 1964-1969.

Wang JC, 2002. Cellular roles of DNA topoisomerase: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3(6): 430-440.

Yang Z, Carey JF, Champoux JJ, 2009. Mutational analysis of the preferential binding of human topoisomerase I to supercoiled DNA. *FEBS J.*, 276(20): 5906-5919.

Zhang L, Ma DJ, Zhang YN, He WZ, Li CR, Jiang HY, 2013. Characterization of DNA topoisomerase-1 in *Spodoptera exigua* for toxicity evaluation of camptothecin and hydoxy-camptothecin. *PLoS ONE*, 8(2): e56458.

(责任编辑：赵利辉)